


## Quick high-effective separation and purification method of virus related to recombinant adenovirus and its application

**Patent number:** CN1272538  
**Publication date:** 2000-11-08  
**Inventor:** WU XIAOBING (CN); DONG XIAOYAN (CN); HOU YUNDE (CN)  
**Applicant:** BEIJING DONGKANGLONG VIRUS BIO (CN)  
**Classification:**  
- **International:** **A61K48/00; A61P43/00; C12N7/02; C12N15/861; A61K48/00; A61P43/00; C12N7/02; C12N15/861; (IPC1-7): C12N7/02; A61K48/00; C12N15/861**  
- **European:**  
**Application number:** CN19991023723 19991117  
**Priority number(s):** CN19991023723 19991117

Also published as:

 CN1139656C (C)

[Report a data error here](#)

### Abstract of CN1272538

By utilizing AAV virus particles with characteristics of resisting chloroform treatment, the present invention provides a method using PEG/NaCl system and chloroform to quickly and high-effectively separate and purify rAAV virus. Said method is suitable for large-scale separation and purification of rAAV virus and its production industrialization. Specially it is applicable to purification of rAAV produced by using HSV virus as auxiliary virus, also can be used for purification of rAAV produced by packaging system without auxiliary virus or external packaging system without cell. The rAAV virus purified by said invention can be used for gene transfer and gene therapy.

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 7/02

C12N 15/861 A61K 48/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99123723.4

[43]公开日 2000 年 11 月 8 日

[11]公开号 CN 1272538A

[22]申请日 1999.11.17 [21]申请号 99123723.4

[71]申请人 北京东康龙病毒生物技术工程研究中心

地址 100052 北京市宣武区迎新街 100 号

[72]发明人 吴小兵 董小岩 侯云德

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 2 页

[54]发明名称 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒相关病毒的方法和用途

### [57]摘要

本发明利用 AAV 病毒颗粒具有抗氯仿处理的特点,提出了一种用 PEG/NaCl 系统和氯仿快速而高效分离和纯化 rAAV 病毒的方法。该方法适合于大规模分离和纯化 rAAV 病毒和生产工艺化。尤其适用于以 HSV 病毒为辅助病毒产生的 rAAV 的纯化,也可用于无辅助病毒包装系统或无细胞体外包装系统生产的 rAAV 的纯化。经本发明纯化的 rAAV 病毒可用于基因转移和基因治疗。

ISSN 1008-4274

1. 本发明提出的 rAAV 病毒纯化方法由以下步骤组成：
  - a) 用氯仿破碎细胞、灭活 HSV 辅助病毒及使大量细胞蛋白变性沉淀；
  - b) 用 DNaseI 和 RNase 处理细胞裂解液以降解核酸；
  - c) 加 NaCl 促使 rAAV 与细胞碎片分离，离心去除细胞碎片；
  - d) 用 PEG/NaCl 沉淀 rAAV；
  - e) 用氯仿抽提去除杂蛋白和残余的 PEG；
  - f) 透析除盐；
  - g) 用密度梯度离心法或亲和层析法进一步纯化 rAAV。
2. 根据权利要求 1，将 a、c、d、e 步骤单独使用。
3. 根据权利要求 1，将 a、c、d、e 步骤与其它方法配合使用。
4. 本发明提出的方法用于 rAAV 的大量分离和纯化制备。
5. 本发明提出的方法用于 AAV 病毒空壳的大量分离和纯化制备。
6. 用本发明制备的 rAAV 用于基因转移和基因治疗。

---

一种快速高效分离和纯化重组腺病毒相关病毒的方法和用途

本发明属于生物技术领域。具体涉及重组腺相关病毒的分离、浓缩和纯化方法，尤其适合大规模制备重组 AAV 病毒以用于基因转移和基因治疗。

病毒载体在基因转移和基因治疗中有广泛的应用。其中腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 因具有无致病性、理化性质稳定、免疫原性弱、可定点整合到真核细胞染色体中从而介导外源基因的长期稳定表达等特点而越来越受到关注，在基因转移和基因治疗领域具有广阔的应用前景。

人 2 型腺相关病毒 (AAV-2) 是目前最常用作病毒载体的腺相关病毒。AAV 病毒为辅助病毒依赖性病毒，其感染复制需要腺病毒或单纯疱疹病毒等的辅助。

AAV-2 病毒的颗粒直径为 20 ~ 24nm，为 20 面体结构。病毒由 20~25% DNA 和 75%~80% 蛋白质组成。在氯化铯溶液中的浮力密度为 1.41g/cm<sup>3</sup>。基因组为 4.7kb 的单链 DNA。基因组两端各有一段 145bp 的重复序列 (ITR)，是 AAV 病毒特有的顺式作用元件，为 AAV 病毒的复制、整合、拯救、包装等所必需。ITRs 之间为 AAV 的编码基因，左边的为 rep 基因，编码 4 种 Rep 蛋白 Rep78, Rep68, Rep52, Rep40；右边的为 cap 基因，编码 3 种外壳蛋白 VP1, VP2, VP3，分子量依次为 87, 72, 62 KDa。AAV 病毒颗粒中 VP3、VP2、VP1 蛋白的比例约为 10:1:1。

Samulski RJ 等 (Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2031, 1982) 将完整的双链 AAV DNA 克隆于 pBR322 质粒中，发现位于质粒中的 AAV 前病毒基因组亦具有形成感染性病毒的能力。因此将外源基因表达单位置于 AAV 病毒的两个 ITR 之间，而 rep 和 cap 基因及辅助病毒的功能则由其它方式反式提供，在细胞中可获得含有外源基因的重组 AAV 病毒。

重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 颗粒的结构与野生型 AAV 相同。所不同的是，重组 AAV 病毒颗粒包装的基因组为单链的两端带有 AAV ITR 序列的外源 DNA。重组 AAV 病毒中可容纳的外源 DNA 长度在 5.0 kb 以内。

经典的 rAAV 产生方法 (Xiao Xiao, Richard Jude Samulski Current Protocols in Human Genetics, Vectors for Gene Therapy, Unit 12.1, 1996) 是用双质粒共转染 293 细胞以及

辅助病毒如 5 型腺病毒 (Ad5) 感染。双质粒中一个是重组 AAV 载体质粒, 另一个为含有 AAV rep-cap 基因的辅助质粒。由于这种方法操作较复杂, 影响 rAAV 产生的因素多, 难以获得高滴度的 rAAV, 不易于扩大生产规模。因此许多研究者致力于改进重组 AAV 病毒 (rAAV) 的产生方法。这些改进包括以下几类: 1) 将 repcap 基因转导到细胞株中, 建成一种包装细胞系。其中的 repcap 的表达受其自身的启动子控制 (Kenji Tamayose, Yukihiro Hirai, and Takashi Shimada, A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography, Human Gene Therapy 7:507-513, 1996), 或换成其它组成型或可诱导启动子 (Inoue N, Russell DW. Packaging cells based on inducible gene amplification for the production of adeno-associated virus vectors. J. Virol 72:7024-7031, 1998); 2) 将 AAV ITRs 和其间的的外源基因表达单位 DNA 插入腺病毒基因组中, 构建一种嵌合型重组腺病毒 (Guang-Ping Gao, Guang Qu et al. High-titer adeno-associated viral vectors from a rep/cap cell line and hybrid shuttle virus Human Gene Therapy 9:2353-2362, 1998; Liu XL, Clark KR, Johnson PR Production of recombinant adeno-associated virus vectors using a packaging cell line and a hybrid recombinant adenovirus. Gene Ther 1999 Feb;6(2):293-9)。3) 将 AAV ITRs 和其间的的外源基因表达单位 DNA 置于自主复制的 EBV 病毒载体中, 转导至细胞中, 建成一种携带具有自主复制能力的重组 AAV 载体质粒的细胞株 (颜子颖, 姚二梅等, 以 EBV 复制子为基础的新型重组 AAV 载体包装系统, 科学通报, 42(17):1860-1863, 1997)。4) 将 repcap 基因插入腺病毒基因组中, 构建一种具有完全辅助功能的重组腺病毒。然而许多实验证明, 这种思路难以实现。可能是由于 rep 蛋白对腺病毒的强烈抑制作用使得含有 repcap 基因的重组腺病毒无法产生。5) 用 HSV 病毒扩增子携带 repcap 基因, 产生具有完全辅助功能的 HSV 混合病毒 (James E. Conway, Sergei Zolotukhin et al. Recombinant adeno-associated virus type 2 replication and packaging is entirely supported by a herpes simplex virus type 1 amplicon expressing rep and cap, J. Virol 71(11):8780-8789, 1997; 舒跃龙, 吴小兵, 杨天忠, 黄惠宇, 侯云德, 颜子颖 以 HSV-1 扩增子载体构建的新型重组 AAV 载体包装系统 中国科学 (C 辑) 28(5):

457-462, 1998)。6) rAAV 病毒体外包装(无细胞包装)(Zhou XH, Muzyczka N. In vitro packaging of adeno-associated virus DNA, J Virol 72(4):3241-3247, 1998)。

我们曾提出了“一株载体细胞/一株辅助病毒”的生产策略(中国专利申请号 98120033.8, 及 99119039.4, 伍志坚, 吴小兵等 具有 AAV 载体包装功能的重组 HSV 的产生, 科学通报 44 (5): 506—509) 用携带了 AAV 病毒 rep-cap 基因的重组 HSV-1 病毒(HSV1-rc)感染稳定整合了重组 AAV 载体 DNA 的载体细胞株, 从病变的细胞中可获得大量的 rAAV 病毒。用 rHSV-rc 病毒感染载体细胞株时, HSV1-rc 病毒进入细胞后其 DNA 大量复制并最终产生子代病毒。HSV1-rc 病毒 DNA 复制时携带的 rep-cap 基因亦同步复制, 从而产生高拷贝的 rep-cap 基因。Rep 基因编码产生 4 种 Rep 蛋白(Rep78, Rep68, Rep52, Rep40), 使重组 AAV 载体 DNA 从细胞基因组上拯救出来并大量复制最终成为单链被包装到 AAV 壳粒中; cap 基因编码 3 种外壳蛋白 VP1, VP2, VP3, 在细胞核内组装成壳粒。该方法有效地解决了 rAAV 的大规模产生问题。

研究中我们发现, 用重组 HSV-1 病毒 HSV1-rc 感染未转染 AAV 载体 DNA 的 BHK-21 细胞, 也可以产生大量 AAV 病毒颗粒。只是这种病毒颗粒为病毒空壳。说明 AAV 病毒形成病毒颗粒时是预装好病毒空壳后再将基因组 DNA 包裹到壳粒中。

如何高效地分离和纯化大量的 rAAV 是其应用的又一个关键问题。目前有关重组 AAV 分离和纯化的报道较少。传统的纯化方法采用硫酸铵分步盐析法将 rAAV 与细胞碎片分离并使之浓缩, 然后用 2~3 轮氯化铯梯度离心获得 rAAV 组分, 最后用透析方法除去氯化铯和其它盐。这种方法既费时费力, 又使 rAAV 的感染性有较大的损失, 且回收率低。因此, 许多研究者致力于发展新的纯化方法。近年来报道的柱层析方法(Kenji Tamayose, Yukihiko Hirai, and Takashi Shimada, A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography, Human Gene Therapy 7:507-513, 1996; S Zolotukhin, Bj Byrne et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Therapy 6: 973-985, 1999; Dirk Grimm,

## 说 明 书

Andrea kern et al. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors, Human Gene Therapy 9:2745-2760, 1998)使 rAAV 的纯化过程大大简化,而且回收率有较大提高。但这些方法亦有成本高、处理大体积样品能力有限、实验条件和仪器设备要求高等缺点。

一般地,重组 AAV 病毒纯化过程可分为以下步骤:

- 1) 细胞裂解(无细胞系统除外):最经典的方法是采用反复冻融 3~4 次的方法。将含有 rAAV 病毒的细胞及培养液收集在一起,在干冰/乙醇浴和 37℃水浴中反复冻融 3~4 次,目的是破碎细胞以释放 rAAV。这种方法的缺点是 rAAV 病毒释放不全。其它方法还有超声波破碎细胞法、脱氧胆酸法等。
- 2) 辅助病毒灭活(无辅助病毒包装系统除外):利用腺病毒和单纯疱疹病毒对热敏感的特点,一般用 56℃水浴 30~2hr 灭活辅助病毒。
- 3) 重组 AAV 病毒与细胞碎片分离:一般用低速离心除去细胞碎片。
- 4) 重组 AAV 病毒与其它组分分离及浓缩:最常采用的方法是氯化铯密度梯度超速离心法。其分离依据是成熟的 AAV 病毒颗粒的浮力密度为 1.40~1.42 g/cm<sup>3</sup>。最近,等用抗 AAV 病毒颗粒的单克隆抗体制成亲和层析柱,用来分离 rAAV 获得很好的纯化和浓缩效果。
- 5) 纯化的重组 AAV 的纯度和滴度检测:纯度的主要检测方法有 HPLC、SDS-PAGE 电泳、紫外分光光度分析、电泳分析等。滴度测定包括物理滴度(particles/ml)和感染滴度(TU/ml)的测定。

本发明提出了一种分离纯化 rAAV 病毒的新方法,其特点是简便快速、纯化效果好、rAAV 病毒的回收率高、成本低且易于放大至工业化生产规模。

本发明提出的 rAAV 病毒分离纯化方法主要由以下步骤组成:

- 1) rAAV 的大量产生:用 HSV1-rc 为辅助病毒感染含有目的基因的 AAV 载体细胞株,待细胞出现完全 CPE 变化并漂浮起来时(约 48~72hr),收获细胞培养物(细胞及培养液)作为粗制裂解液,测量其体积;

- 2) 辅助病毒灭活及细胞裂解：用氯仿处理原料液可达到灭活辅助病毒 HSV1-rc 和裂解细胞的双重目的，但对 AAV 病毒没有影响。有感染性的单纯疱疹病毒颗粒有双层脂质外膜及镶嵌在其中多种病毒糖蛋白，该层被膜是 HSV 病毒感染细胞所必需的。氯仿可以溶解脂质，并使大量蛋白变性。用氯仿处理可 100% 灭活 HSV 病毒，同时可以高效裂解细胞膜和核膜。AAV 病毒颗粒具有氯仿抗性，用氯仿处理对其结构和感染活性没有影响。
- 3) 细胞碎片和变性蛋白的去除：在细胞裂解液中加入固体氯化钠至终浓度 1.0 ~ 1.2mol/L，搅拌溶解。11000g 离心 10~15min。将上清移入一干净三角烧瓶中，估算其体积。弃去离心的沉淀和下层氯仿。加氯化钠可促使 AAV 病毒颗粒与细胞碎片分离，也是下一步用聚乙二醇沉淀 AAV 病毒所必需。
- 4) 在上清中加入固体聚乙二醇 8000 至终浓度 6~12%，搅拌溶解。4℃放置 1 小时以上至过夜。12000g 离心 10~15min。将上清倾入另一干净烧瓶中，尽量让上清流尽。沉淀用适量的 PBS<sup>2+</sup>溶解，加 DnaseI 和 RNase 消化 AAV 病毒颗粒之外的残余 DNA 和 RNA。加等体积的氯仿抽提，12000g 离心 5min，在无菌操作下小心吸出上层水相，移入无菌管中。该液体即为浓缩和纯化的 rAAV 病毒液。

本发明提出的 rAAV 纯化方法获得的 rAAV 病毒纯度可达到 >99%。从  $2 \times 10^9$  cells (5 只 110×288mm 转瓶) 粗制裂解液中制备的 rAAV 滴度可达到  $10^{14-15}$  particles/ml，感染滴度可达  $>10^{12-13}$  TU/ml。rAAV 的回收率 >90%。获得的 rAAV 可用于体外实验和动物实验，进一步纯化后可获得临床级的 AAV 产品。

该病毒液进一步纯化可采用双液相萃取方法。用 PEG/盐系统或 PEG/Dex 系统。最终用透析去除 PEG 和盐，用超滤除菌。

进一步纯化亦可采用柱层析（包括分子筛层析、亲和层析）或氯化铯超速离心，及透析和超滤等方法。

本发明提出的 rAAV 纯化方法尤其适合于用单纯疱疹病毒为辅助病毒产生的 rAAV 的纯化，亦适合于用无辅助病毒生产系统及体外包装系统获得的 rAAV 的纯化。



## 说 明 书

## 实施例 1

## 用转瓶生产 rAAV-GFP 病毒

将报告基因 GFP 插入通用型 AAV 载体 pSNAV-1 中, 构建成重组 AAV 载体 pSNAV-1/GFP。将 pSNAV-1/GFP 用 Lipofectamine (GIBCO BRL) 转染试剂导入 BHK-21 细胞 (购自 ATCC, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液 37% 培养) 中, 加 G418 800 $\mu$ g/ml 选择培养 10~15d。获得混合细胞克隆的载体细胞。将该载体细胞扩大培养至 4 只 35cm<sup>2</sup> 的方形玻璃培养瓶中, 长满 (约有  $8 \times 10^7$  个细胞) 后用胰酶消化, 接种到 1 只转瓶 (110  $\times$  288mm) 中, 37 $^{\circ}$ C 低速转动 (1 转/分钟) 培养。培养液体积为 200ml/转瓶。3d 后将该转瓶中的细胞用胰酶消化传入 5 只转瓶中扩大培养。待细胞长满后 (约有  $2 \times 10^9$  个细胞), 将培养液倾出, 加辅助病毒 HSV-rc/ $\Delta$ UL2 (在 HSV1 病毒基因组的 UL2 基因的 XbaI 位点中插入 AAV repcap 基因, 中国专利申请号 98120033.8) 5~10ml (MOI = 0.5~2), 低速转动 (1 转/分钟) 吸附病毒 1~2hr。加 200ml/转瓶无血清 1640 培养液 37 $^{\circ}$ C 低速转动 (1 转/分钟) 培养。待细胞完全病变、容易脱落时, 盖紧瓶盖剧烈振荡, 将瓶壁上的细胞全部洗脱至培养液中。收集合并 5 转瓶的培养物, 估算其体积, 分装至 500-ml 三角烧瓶中, 250ml/瓶。用于下一步纯化。

## 实施例 2

## 用本发明提出的纯化方法纯化 rAAV

接实施例 1。在每一只三角瓶中加入氯仿 25ml (10:1 v/v), 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中剧烈振荡 1~1.5hr。取出在室温下静置 10min。加 DNase 和 RNase 至终浓度 1 $\mu$ g/ml。轻轻混匀, 室温下消化 30~60min。加入固体氯化钠至终浓度 1mol/L, 振荡溶解。4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 15min。取出上层水相, 弃去氯仿和沉淀。加 PEG8000 至终浓度 10% (w/v)。振荡溶解。4 $^{\circ}$ C 放置过夜。4 $^{\circ}$ C 11000rpm/min 离心 15min。将上清倒入干净容器中。将离心管倒扣在吸水纸上, 让上清尽量流尽。用 5ml PBS<sup>2+</sup> 缓冲液将各离心管管底和管壁上的沉淀吹打洗脱下来合并, 将其分装至 1.5-ml 塑料离心管中 (0.6ml/管), 加等体积的氯仿抽提。4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 5min, 在无菌操作下小心吸出上层水相, 移入无菌管中。该液体即为浓缩和纯化的 rAAV-GFP 病毒液。该病毒液体积比初始体积浓缩了 200 倍。

## 实施例 3

## AAV 空壳病毒颗粒的生产和纯化

用转瓶培养 BHK-21 细胞。细胞长满后加辅助病毒 HSV-rc/ $\Delta$ UL2 用与实施例 1 相同的方法获得病变细胞培养物。用本发明提出的 rAAV 纯化方法提取该培养物的 AAV 病毒。获得的病毒液进行电镜观察（附图三），可见大量病毒颗粒，颗粒中心密度较高，表明为病毒空壳。该结果说明用辅助病毒 HSV-rc/ $\Delta$ UL2 感染没有转染 AAV 载体 DNA（不含 ITR 序列）的 BHK 细胞可有效地产生 AAV 病毒空壳颗粒。

## 实施例 4

## rAAV 病毒滴度和纯度检测

接实施例 2。用地高辛标记（Boehringer Mannheim 试剂盒）的 GFP 探针点杂交方法检测纯化的病毒液中 rAAV-GFP 病毒的滴度（particles/ml）。取 10ul 纯化的病毒液用 PBS<sup>2+</sup> 缓冲液稀释 10 倍。加 DNase 和 RNase 至终浓度 1ug/ml 37℃ 消化 1hr。沸水浴 5min 之后置于冰浴中。用 dilution buffer 10 倍比系列稀释后点膜，1ul/点。120℃ 烤膜 30min。68℃ 预杂交 1hr。加探针 68℃ 杂交过夜。洗膜，显色。结果第 1~4 点明确阳性，第 5 点弱阳性。假设点杂交方法检测 DNA 的灵敏度为  $10^6$  分子，计算病毒滴度 =  $10^{4-5} \times 10^6 \times 10 \times 1000 = 10^{14-15}$  particles/ml。

用 SDS-PAGE 电泳法检测纯化的病毒液中 AAV 病毒的纯度。灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶。分离胶浓度为 10%。分别取纯化的病毒液和最后一步氯仿抽提前的病毒液 20ul，加 2×loading buffer 20ul。沸水浴 3min。每孔加样 10ul，200V 电泳 1hr。电泳完毕后用考马斯亮蓝 R250 染色液（在 45ml 甲醇 45ml 水和 10ml 冰醋酸中溶解 0.25g 考马斯亮蓝 R250）染色，用相应的脱色液脱色。蛋白质分子量 Markers 的大小依次为 97400，66200，42700，31000，14400Dal（Promega）。电泳结果见说明书附图 1。电泳结果显示，用本发明提出的纯化方法获得的纯化的 rAAV 病毒液电泳表现为三条带（lane1），其大小分别与 3 种 AAV 外壳蛋白的大小相符合（野生型 AAV-2 外壳蛋白 VP1 为 87kDal，VP2 为 72kDal，VP3 为 62kDal，），占总蛋白 99% 以上；氯仿抽提可极为有效地去除杂蛋白，却不损失 AAV 病毒蛋白；经对 lane1 进行计算机扫描处理，求出三条蛋白带的强度

## 说 明 书

---

比，恰好为 10:1:1，与 AAV-2 病毒颗粒的 VP3、VP2 和 VP1 的比例相吻合。

### 实施例 5

#### rAAV 病毒的电镜分析

将实施例 2 中纯化的 rAAV-GFP 病毒液经负染后在电镜下观察，可见大小均匀一致、清晰可辨的实心病毒颗粒。粒径约为 20~24nm。见说明书附图 2。

### 实施例 6

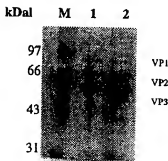
#### rAAV-GFP 感染性滴度的测定

用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养液 37℃，5% CO<sub>2</sub> 培养 HeLa 细胞。在 24 孔板上接种 HeLa 细胞， $5 \times 10^5$  细胞/孔。培养过夜后，吸出培养液；取 10ul 纯化的病毒液稀释至 1ml，以 10 倍比系列稀释，每孔加不同稀释度的病毒液 0.5ml，37℃培养 1hr。每孔加 5 型腺病毒 (Ad5) 50ul (MOI=5)，及培养液 0.5ml。37℃培养 36hr 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光细胞，计数其中某孔的绿色细胞数  $n$  ( $10 < n < 100$ )。计算 rAAV-GFP 病毒滴度： $n \times \text{稀释倍数} \times 1000/5 = n \times 10^9 \times 200 = 2n \times 10^{11}$  TU/ml。估算 rAAV-GFP 的感染滴度为  $2 \times 10^{12 \sim 13}$  TU/ml 之间。

99.11.17

## 说明书附图

附图一 10%SDS-PAGE 凝胶电泳检测 rAAV-GFP 病毒外壳蛋白 (考马斯亮蓝 R250 染色)



M: 分子量标准蛋白质; 大小依次为 97400, 66200, 42700, 31000, 14400Dal (Promega)。

Lane1: 用本发明提出的方法纯化的 rAAV-GFP 病毒液 5ul 加 5ul 2×loading buffer。

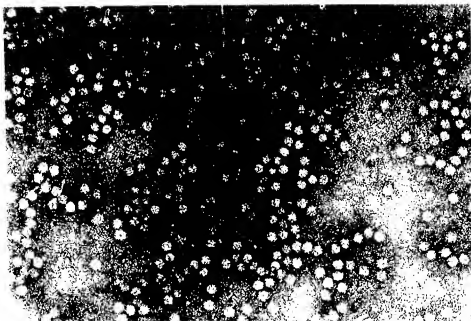
Lane2: 未经最后一步氯仿抽提的 rAAV-GFP 病毒液 5ul 加 5ul 2×loading buffer。

2×loading buffer: 100mmol/L This.Cl (pH6.8), 200mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20%甘油。

## 说明书附图

---

附图二 纯化的 rAAV-GFP 病毒的电镜分析 ( $\times 31000$ )



附图三 纯化的 AAV 空壳病毒的电镜分析 ( $\times 38000$ )

